



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Perfil de resistencia a drogas de primera línea y diversidad genómica de
aislados de *Mycobacterium tuberculosis* en el distrito de San Juan de
Lurigancho, 2013-2021**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor

Ericka Madeleine Meza Heredia

Asesor

Dr. Pablo Tsukayama Cisneros

Co-Asesor

Dr. Cesar Augusto Ugarte Gil

Lima, Perú

2024

Jurado calificador

Presidente: PhD. Larissa Otero Vegas

Vocal: Dra. Melissa Marlene Mendez Aranda

Secretario: MSc. Maribel Denise Riveros Ramirez

Similitud 13% Marcas de alerta

UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Perfil de resistencia a drogas de primera línea y diversidad genómica de aislados de Mycobacterium tuberculosis en el distrito de San Juan de La Virgencho, 2013-2021

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor
Ericka Madeleine Maza Heredia

Aseor
Dr. Pablo Tinkayama Cisneros

Co-Aseor
Dr. Cesar Augusto Ujarte Gil

Lima, Perú

2024

Página 1 de 50 10684 palabras 82%

13% Similitud General

29 Exclusiones →

Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas

1 Internet
hdl.handle.net 2%
22 bloques de texto 195 palabra que coinciden

2 Internet
repositorio.upch.edu.pe 1%
10 bloques de texto 106 palabra que coinciden

3 Internet
repositorio.unfv.edu.pe <1%
6 bloques de texto 56 palabra que coinciden

4 Internet
docplayer.es <1%
4 bloques de texto 38 palabra que coinciden

5 Internet

INDICE

Resumen.....	1
ABSTRACT.....	2
I. Introducción.....	3
II. Hipótesis o Pregunta de Investigación y Objetivos.....	8
2.1 Pregunta de Investigación.....	8
2.2 Objetivos.....	8
III. Materiales y métodos.....	9
3.1. Selección de estudios observacionales.....	9
3.2. Selección de centros de salud.....	12
3.3. Selección de aislados de M. tuberculosis.....	14
3.4. Materiales.....	17
3.5. Métodos.....	18
3.5.1. Análisis bioinformático.....	18
3.5.2. Análisis filogenético.....	19
3.6. Análisis estadístico.....	19
IV. Resultados.....	20
V. Discusión.....	31
VI. Conclusiones.....	37
VII. Limitaciones.....	37
VIII. Referencias bibliográficas.....	38

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto contagiosa causante de más de 1.3 millones de decesos anuales mundialmente. Últimamente, se ha evidenciado un incremento de cepas resistentes a antibióticos, catalogadas como multidrogo resistente (MDR) y extremadamente resistente (XDR), amenazando las metas mundiales para el control de esta patología. En Sudamérica, Perú presenta el mayor índice de tuberculosis MDR y XDR, y es el segundo país con mayor incidencia de tuberculosis en la región. La implementación de herramientas moleculares ha acelerado el diagnóstico de esta enfermedad, identificando casos resistentes a fármacos en menor tiempo en comparación de ensayos tradicionales basados en cultivos. El secuenciamiento de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) es una herramienta de última generación que permite el análisis del genoma de TB, permitiendo predecir la resistencia a drogas de primera y segunda línea, e identificar linajes de TB, los cuales pueden presentar diferentes características de transmisibilidad, resistencia a drogas, eficacia de vacunas, etc. A pesar del grave problema de salud pública que representa la TB, los estudios de características genéticas y perfil de resistencia a fármacos en Perú, son limitados.

En el presente estudio se empleó WGS para analizar y describir la diversidad genética, los patrones de resistencia a drogas de primera línea en cepas de *M. tuberculosis*, provenientes de pacientes atendidos en cinco centros de salud del distrito de San Juan de Lurigancho, durante el periodo 2013 – 2021. Se identificó a estreptomycinina e isoniazida como las drogas con mayor frecuencia de resistencia fenotípica. Se registró una mayor prevalencia del linaje 4 a comparación del linaje 2, siendo el sublinaje 4.1.2.1 el más prevalente, presentándose en 28.4% de las muestras. La mayoría de mutaciones genéticas se asociaron a resistencias; evidenciándose una alta concordancia entre la resistencia fenotípica y la predicción de resistencia genómica determinados por el WGS.

Palabras clave: Tuberculosis, WGS, Genómica, Bioinformática

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease causing over 1.3 million deaths annually worldwide. In recent years, an increase in clinical strains resistant to antibiotics, specifically those classified as multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR), has been observed, threatening the global goals set to control this pathology. In South America, Peru has the highest incidence of MDR and XDR tuberculosis and is the second country with the highest tuberculosis incidence in the region.

The implementation of molecular tools has accelerated the diagnosis of this disease, enabling the identification of drug-resistant cases in a shorter time compared to traditional culture-based assays. Whole genome sequencing, a next generation tool, analyze TB genome, predicting first and second line TB drugs resistance; it also identifies TB lineages, which can present different patterns on transmissibility, drug resistance, vaccine efficacy, etc. Despite the serious public health problem that tuberculosis represents, studies focused on genetic characteristics and drug resistance profiles in tuberculosis in Peru are limited.

In this study, whole-genome sequencing (WGS) was employed as a tool to analyze and describe the genetic diversity, patterns of resistance to first-line drugs in *M. tuberculosis* isolates from patients treated at five health centers in the San Juan de Lurigancho district during the period 2013–2021. Streptomycin and isoniazid were identified as the drugs with the highest frequency of phenotypic resistance. A higher prevalence of Lineage 4 was recorded compared to Lineage 2, with sub-lineage 4.1.2.1 being the most prevalent, present in 28.4% of the samples. Most observed genetic mutations were associated with resistance, showing a high concordance between phenotypic resistance results and genomic predicted resistance results determined by WGS.

Keywords: Tuberculosis, WGS, genomics, Bioinformatic

I. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa ocasionada por bacterias pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, se considera como una de las enfermedades más antiguas en la historia de la humanidad, emergiendo como un patógeno humano en África hace aproximadamente 70,000 años (1). Anualmente, a nivel mundial se contagian de tuberculosis 10 millones de personas y fallecen 1.3 millones de personas. Según el Centro para el control y la prevención de enfermedades de Estados Unidos (CDC), diariamente, a nivel mundial, fallecen 3500 personas por tuberculosis (2). de este modo la TB se erige como una de las enfermedades de gran importancia y mayor preocupación en salud pública (3). El control y eliminación de esta enfermedad se ven desafiados por su alta transmisibilidad y a la aparición de cepas clínicas resistentes a múltiples fármacos utilizados en el tratamiento antituberculoso (4). Las variantes resistentes a drogas se clasifican como multidrogo resistentes (MDR) si presentan resistencia, al menos, a rifampicina e isoniacida. Anteriormente, una cepa era considerada como XDR si presentaba resistencia a rifampicina, isoniacida, fluoroquinolonas y por lo menos a un inyectable de drogas de segunda línea (5). En 2021, la OMS actualizó las definiciones de tuberculosis extremadamente resistente (XDR) e introdujo la definición “Pre-XDR”. Según esta nueva definición, Pre-XDR se refiere a casos que cumplen con la definición de MDR o Resistente a rifampicina (RR) y que también es resistente a cualquier fluoroquinolona. La definición actualizada de XDR establece que se trata de casos MDR o RR, que también son resistentes a cualquier fluoroquinolona y al menos una droga del grupo A (Levofloxacin, moxifloxacin, bedaquilina o linezolid) (6). La TB RR, MDR, Pre-XDR y XDR son reconocidas formalmente como emergencias de salud pública a nivel mundial (7,8), afectando principalmente a personas en países en vías de desarrollo. La epidemiología, ocurrencia y persistencia de la TB está ligada a varios factores: clínicos, geográficos, demográficos, sociales y al estado del desarrollo del país (9).

En Sudamérica, el Perú se sitúa como el segundo país con mayor incidencia de tuberculosis y el primero con más casos de tuberculosis MDR y XDR (3,10–12). Según el reporte global de tuberculosis del 2023, publicado por la OMS, Perú se encuentra entre los 30 países con mayor carga de tuberculosis MDR o RR (12). (Figura 1)

The three global lists of high-burden countries for TB, HIV-associated TB and MDR/RR-TB to be used by WHO in the period 2021–2025, and their areas of overlap

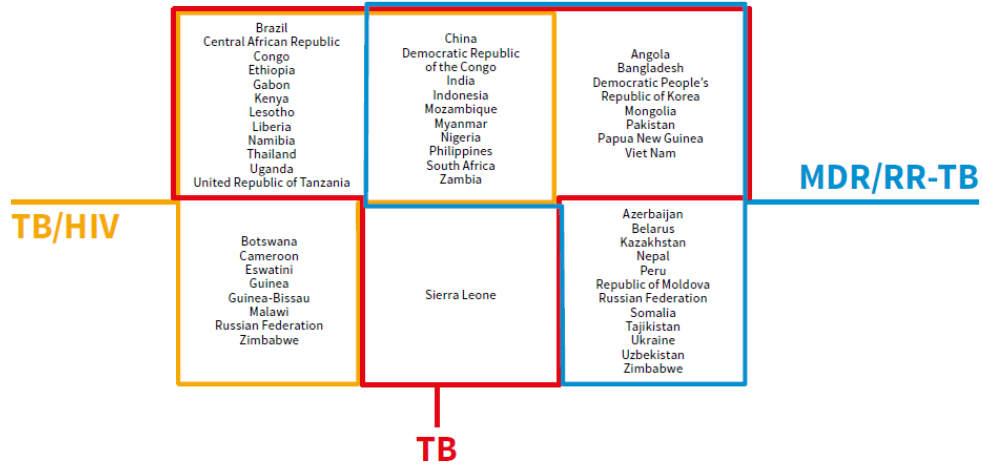


Figura 1. Lista de los países con mayor carga de tuberculosis, tuberculosis asociada a VIH y MDR/RR. Fuente: Reporte Mundial de Tuberculosis 2023, OMS.

La incidencia de tuberculosis en Perú es alta, en 2023 la incidencia de tuberculosis en el país fue de 92.8 casos por 100,000 habitantes, reportándose 32,759 casos de TB y 1,290 casos de TB MDR/RR. Del total de casos de tuberculosis, los hombres representaron el 64.6% de los casos. Así mismo, el grupo etario de 20 a 60 años, fue el grupo con mayor incidencia de TB (13). Está marcada diferencia donde el género masculino y los grupos etarios económicamente activo presentan mayor cantidad de casos de TB, se ha observado también a nivel global (12).

La implementación del tratamiento con supervisión directa, o DOTS, por su siglas en inglés, en 1991 generó una marcada disminución en la incidencia de tuberculosis en el país (14,15). Aunque esfuerzos internacionales han contribuido a la reducción de la incidencia y mortalidad a nivel mundial (3,9), brechas como el bajo número de casos MDR diagnosticados y el riesgo de desarrollar TB MDR y XDR en pacientes previamente tratados, siguen obstaculizando el logro de las metas mundiales y nacionales (11,16,17). A estos factores se suma la aparición de nuevas enfermedades como la pandemia de COVID-19 que comenzó a finales de 2019. Esta pandemia ha impactado significativamente la detección y

notificación de casos de tuberculosis a nivel global, regional y nacional. Se evidenció una reducción del 18% en la notificación de nuevos casos de tuberculosis a nivel global entre 2019 y 2020, seguida de un aumento a partir del 2022 (Figura 2) (12).

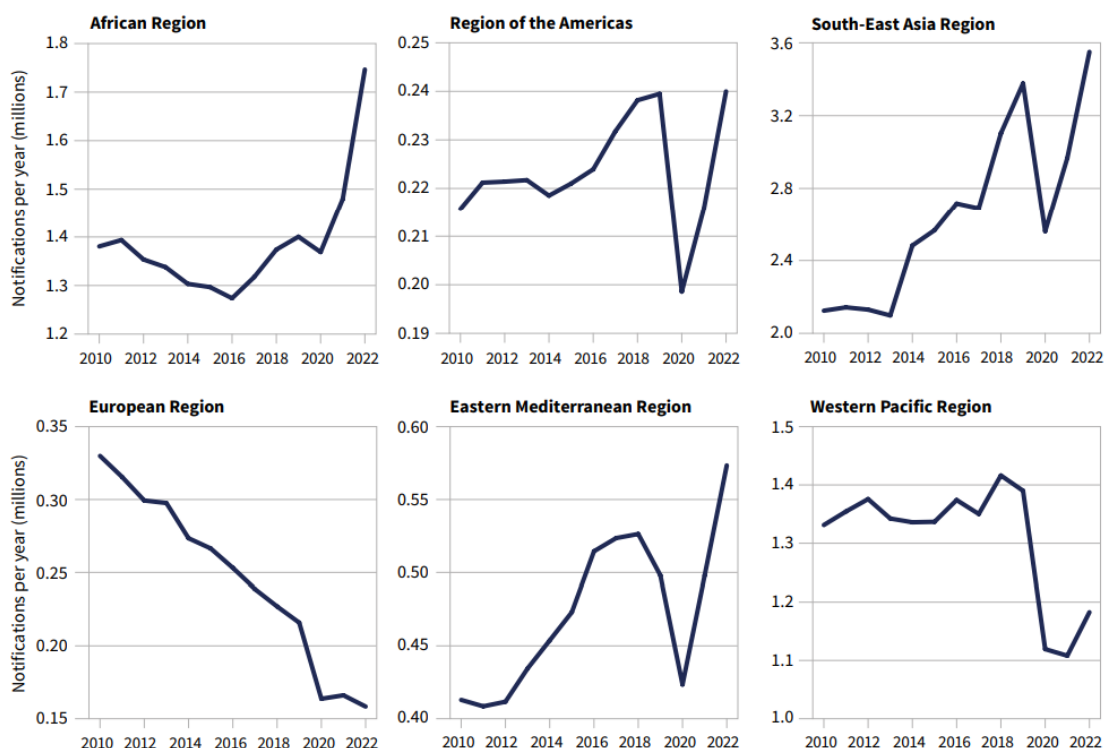


Figura 2. Tendencia en el caso de notificación de nuevos casos de tuberculosis detectados con TB en el mundo y Las Américas. Fuente: Reporte Mundial de Tuberculosis 2023, OMS.

En Perú, Lima Metropolitana registra la mayor tasa de TB y MDR-TB a nivel nacional. En 2017, la tasa de incidencia de TB en Perú fue de 116 casos por 100mil habitantes. (18,19). San Juan de Lurigancho (SJL) es el distrito más poblado de Lima Metropolitana, albergando en el año 2022 a 1,225,092 habitantes (20,21). La incidencia de tuberculosis en SJL es alta, presentando 100 casos por 100mil habitantes (19). En 2017 registró 1800 nuevos casos de tuberculosis pulmonar frotis positivo (TFP), de los cuales 100 presentaron coinfección TB/VIH (22). En 2018, se identificaron 1632 casos de TFP, 228 casos de TB MDR y 7 casos de TBXDR (23). La tuberculosis es un problema con impacto sanitario a nivel de comunidad,

priorizado en SJL debido a la alta incidencia de la enfermedad en el distrito. Durante el periodo 2014-2016, la tuberculosis se encontró entre las primeras 5 causas específicas de mortalidad en poblaciones adolescente, adulto joven y joven de SJL (19). Factores como la pobreza, malnutrición y el hacinamiento han favorecido la masiva transmisión de esta enfermedad en este distrito (24,25). A pesar de esta grave situación de salud pública, hay escasos estudios que aborden las características genéticas de las cepas de tuberculosis y el perfil de resistencia a drogas presente en el distrito.

La necesidad de herramientas de diagnóstico rápido y confiables, ha encontrado una respuesta en el desarrollo de técnicas moleculares, como el sistema GeneXpert MTB/RIF Ultra o el sistema Truenat MTB Plus, capaces de detectar la presencia de *M. tuberculosis* y resistencia a rifampicina en menos de 2 horas (26,27), Estas innovaciones superan las limitaciones de las pruebas micobacteriológicas convencionales, agilizando el tratamiento y manejo de la enfermedad (28).

El secuenciamiento de genoma completo ha revolucionado el campo de la microbiología clínica, permitiendo una amplia gama de análisis a nivel genómico (29), como la identificación de genes, sus funciones y su implicación en enfermedades, determinación de perfiles de resistencia a drogas, etc. (30,31). Actualmente, en el área de investigación en TB, el secuenciamiento de genoma completo brinda información valiosa utilizada para el análisis de vías metabólicas, mejora de diagnósticos, epidemiología de transmisión de esta enfermedad, estudio de brotes, análisis de diversidad genética y predicción de resistencia a drogas (32,33). El estudio de Wu y colaboradores, demostró que el secuenciamiento de genoma completo es una herramienta prometedora para la predicción de resistencias a drogas en *M. tuberculosis*. En este estudio se observó que la sensibilidad y especificidad para el secuenciamiento de genoma completo fue de 94.5% y 92.0% para isoniacida, 97.1% y 100.0% para rifampicina, 97.6% y 64.4% para etambutol, 97.1% y 95.8% para estreptomina, 93.0% y 98.9% para ofloxacino y 75.0% y 100.0% para amikacina respectivamente, en comparación a ensayos fenotípicos. La mutación de genes específicos se relacionó a la resistencia de drogas antituberculosas isoniacida (genes *katG*, *ahpC*, *fabG1*, *inhA*), rifampicina (*rpoB* y *rpoC*), etambutol (*embA* y *embB*), estreptomina (*gid*, *rpsL* y

rrs), ofloxacina (*gyrA* y *gyrB*) y amikacina (*rrs*) (34). Otro estudio similar realizado en Perú por Puyén y colaboradores, demostró que el WGS presenta una alta concordancia, sensibilidad y especificidad con los resultados obtenidos a través del sistema BACTEC MGIT 960, o la prueba de sensibilidad fenotípica para drogas de primera y segunda línea (35).

El uso de la técnica WGS, ha permitido estudiar la diversidad genética de *M. tuberculosis*. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* presenta siete linajes adaptados a generar infección en humanos. Los linajes son diferenciados en base a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) y polimorfismos en regiones de diferencias. Cada linaje presenta diferentes características evolucionarias, transmisibilidad, resistencia a drogas, latencia y efectividad de vacunas; así mismo, se ha observado que los linajes se distribuyen geográficamente (Figura 3) (36,37).

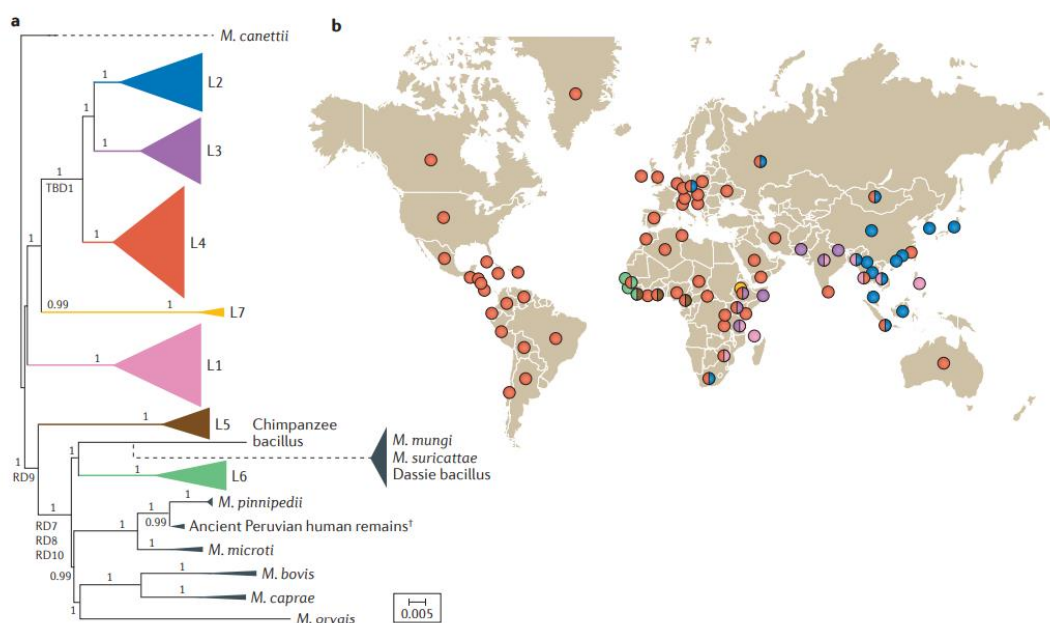


Figura 3. Distribución geográfica de linajes de MTBC. Fuente: Gagneux S. 2018

Diversas investigaciones en América latina, encontraron que el linaje Euro-Americano 4 es dominante en Sudamérica. En el Perú, distintos estudios de diversidad genética, indican la presencia de cepas con genotipo LAM (20-23.8%), Harleem (22.3-33.73%), Beijing (9.22-

9.3%), Grupo T (23.8-24.88%) y Clado X (0.71%) (32,38). El linaje 2 llegó a Perú a través de migraciones desde China, alrededor de los años 18840 a 1906, periodo en el cual llegaron a Perú alrededor de 100,000 trabajadores provenientes de China, a laborar en latifundios, vías ferras e islas guaneras.(39,40)

El presente estudio utilizó la técnica de WGS como herramienta para describir la diversidad genética y patrones de resistencia a drogas de primera línea, en cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a pacientes atendidos en cinco centros de salud del distrito de San Juan de Lurigancho durante el periodo 2013 – 2021.

II. Hipótesis o Pregunta de Investigación y Objetivos

2.1 Pregunta de Investigación

¿Cuál es la diversidad genética y perfil de resistencia de 88 cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a cinco centros de salud del distrito de San Juan de Lurigancho, en el periodo 2013-2021?

2.2 Objetivos

- **General**

Caracterizar la diversidad genética y el perfil de resistencia de 88 aislados de *M. tuberculosis* provenientes de cinco centros de salud del distrito más poblado de Lima, San Juan de Lurigancho, en el periodo 2013-2021.

- **Específicos**

- Determinar los patrones fenotípicos de resistencias a drogas antituberculosas en 88 aislados de *M. tuberculosis* provenientes a cinco centros de salud del distrito de San Juan de Lurigancho, durante el periodo 2013-2021.
- Determinar los linajes genéticos de los 88 genomas *M. tuberculosis*.
- Predecir el mecanismo genético de resistencia a drogas de primera línea de estos 88 aislados a partir de su genoma completo.

- Determinar la concordancia para la determinación de la resistencia a drogas de primera línea, entre la prueba de susceptibilidad fenotípica y el secuenciamiento de genoma completo.

III. Materiales y métodos

Los 88 aislados de *M. tuberculosis* seleccionados para este estudio provienen de participantes enrolados en estudios observacionales realizados en cinco centros de salud ubicados en el distrito de San Juan de Lurigancho (Lima, Perú) durante los años 2013 a 2021. Los centros de salud son Huáscar II, Huáscar XV, José Carlos Mariátegui, Juan Pablo II y La Libertad (Figura 4).

A continuación, se explicará los métodos de selección, criterios de inclusión y exclusión de los estudios y centros de salud.

3.1. Selección de estudios observacionales

Los estudios observacionales seleccionados se realizaron durante los años 2013 a 2021, en la Unidad de Investigación en Tuberculosis del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los criterios de inclusión y exclusión se mencionan a continuación:

Criterios de inclusión

- Estudios realizados en el distrito San Juan de Lurigancho
- Estudios que cuenten con aislados crio preservados de *M. tuberculosis*
- Estudios que cuenten con resultados completos de pruebas de laboratorio Baciloscopía Auramina, Cultivo sólido Löwenstein-Jensen y/o Líquido MGIT y Prueba de susceptibilidad a drogas de primera línea (Estreptomycin, Isoniacida, Rifampicina y Etambutol)
- Estudio que enrole participantes con síntomas de tuberculosis (Tos persistente por al menos 2 semanas)

Criterios de exclusión

- Estudios que no permitan el uso de aislados de *M. tuberculosis* en estudios futuros.
- Ensayos Clínicos.

En base a los criterios de Inclusión y Exclusión, se eligieron los estudios. Cabe indicar que esta selección de estudios se realizó en dos periodos. La primera selección toma en cuenta estudios realizados desde el año 2013 al año 2017, y la segunda selección añadió estudios realizados desde el año 2018 al 2021.

Los siguientes estudios corresponden al periodo 2013-2017:

- 1) Banco de muestras de tuberculosis drogo-resistente. Colección, Almacenamiento y distribución. Sponsor: FIND.

SIDISI 63273

Año de desarrollo del estudio: 2013 al 2016

El propósito de este estudio fue coleccionar y almacenar muestras clínicas de referencias bien caracterizadas, provenientes de individuos adultos con tuberculosis drogo-resistente, con el fin de acelerar el desarrollo de nuevas técnicas de susceptibilidad a drogas. En este estudio se incluyeron: sospechosos de TB nuevo con resistencia a rifampicina detectada por GeneXpert MTB/RIF, casos de recaída de TB, casos de retratamiento luego de fracaso de tratamiento, fracaso de régimen de categoría I o II, casos de contacto de TB-MDR que han sido diagnosticados con TB.

- 2) Banco de Muestras de Tuberculosis IV: Colección, Almacenamiento y Distribución.

Sponsor: FIND.

SIDISI 66172.

Año de desarrollo del estudio: 2016 al 2019

El propósito de este estudio fue coleccionar y almacenar muestras clínicas de referencias bien caracterizadas, provenientes de individuos adultos con tuberculosis para estudios futuros que permitan mejoras en el diagnóstico de tuberculosis.

Para este estudio, se tomaron en cuenta, durante la primera selección de muestras, las muestras coleccionadas desde el año 2016 al 2017.

3) LAM ad-hoc Collection Protocol: Collection, Storage and distribution

Sponsor: FIND.

SIDISI: 100021

Año de desarrollo del estudio: 2017

El propósito de este estudio fue coleccionar y almacenar muestras clínicas de referencias bien caracterizadas, provenientes de individuos adultos con tuberculosis, incluyendo a personas que viven con VIH, para acelerar el desarrollo de diagnósticos basados en LAM y biomarcadores de TB.

Los siguientes estudios corresponden al periodo 2018-2021:

Para esta selección se consideraron las muestras coleccionadas del periodo 2018-2019 del estudio “Banco de Muestras de Tuberculosis IV: Colección, Almacenamiento y Distribución” SIDISI 66172.

4) Verificación en campo de la presencia de Lipoarabinomano Micobacterial (LAM) – Colección, almacenamiento & distribución.

Sponsor: FIND.

SIDISI: 200415

Año de desarrollo del estudio: 2020 al 2021

El propósito de este estudio fue coleccionar y almacenar muestras clínicas de referencias bien caracterizadas, provenientes de individuos adultos con tuberculosis, incluyendo

a personas que viven con VIH, para acelerar el desarrollo de diagnósticos basados en LAM y biomarcadores de TB.

5) TB Reference Materials (TBRM) – Collection, Storage & Distribution.

Sponsor: FIND.

SIDISI: 102415

Año de desarrollo del estudio: 2020 al 2021

El propósito de este estudio fue coleccionar y almacenar muestras clínicas de referencias bien caracterizadas, provenientes de individuos adultos con tuberculosis para acelerar el desarrollo de nuevos diagnósticos de TB en países de alta carga de tuberculosis.

Es importante mencionar que los estudios seleccionados solicitaban que a todos los participantes positivos a tuberculosis se les realizase la prueba de susceptibilidad fenotípica BACTEC SIRE MGIT, el cual analiza la sensibilidad a las drogas de primera línea estreptomina, isoniacida, rifampicina y etambutol. La droga pirazinamida, a pesar de ser un fármaco de primera línea, no fue realizado en los estudios de investigación, por lo que no podrá ser evaluado en el presente proyecto.

Entre todos los estudios evaluados, se registraron 1780 aislados positivos para MTB, que pertenecen al distrito San Juan de Lurigancho.

3.2. Selección de centros de salud

Para la selección de los centros de salud, se realizó los siguientes pasos:

- 1) Obtener el número total de muestras positivas a tuberculosis del periodo 2013 al 2017, tomando en cuenta solamente la población de los estudios seleccionados.
- 2) Ordenar los centros de salud, de mayor a menor, en base a la cantidad de muestras positivas a tuberculosis colectadas durante los años 2013 al 2017.

- 3) Ordenar los centros de salud, de mayor a menor, en base a la cantidad de muestras TB MDR, colectadas durante los años 2013 al 2017.
- 4) Seleccionar los 03 primeros centros de salud que cumplan con las siguientes características:
 - a. Enrolamiento consecutivo durante el periodo 2013 al 2017
 - b. Presencia de casos TB MDR consecutivamente durante el periodo 2013 al 2017

Luego de seguir los pasos y los criterios de selección de los centros de salud, se logró seleccionar los siguientes centros de salud:

- Huáscar II
- Huáscar XV
- Juan Pablo II

Sin embargo, durante la selección de estudios del periodo 2018-2021, los estudios que cumplían los criterios de inclusión para el proyecto, ya no se encontraban enrolando en el centro de salud Juan Pablo II, por lo que solo se logró seleccionar muestras correspondientes al periodo 2013-2017 en ese establecimiento de salud.

En reemplazo al centro de salud Juan Pablo II, se incluyó al centro de salud José Carlos Mariátegui, que se encontraba entre los primeros centros con mayor carga de TB y TB MDR, y que además se encuentra geográficamente cercano al centro de salud Juan Pablo II. Este centro de salud cuenta con enrolamientos constante durante el periodo 2013 al 2021.

Posteriormente se decidió expandir la cantidad de establecimiento a 05 centros de salud, con la finalidad de abarcar más área geográfica en el distrito SJL, añadiéndose al C.S La Libertad, este centro de salud cumple con los criterios para inclusión de establecimientos de salud. Sin embargo, por temas presupuestales solo se logró secuenciar 03 cepas.

Por lo que los centros de salud utilizados en el presente estudio son:

- Huáscar II
- Huáscar XV
- Juan Pablo II
- José Carlos Mariátegui
- La Libertad

Luego de la selección de los centros de salud, entre los 5 establecimientos se contabilizaron 531 aislados MTB positivos, esto representa el 29.6% del total de aislados MTB positivos registrados en los 05 estudios seleccionados.

3.3. Selección de aislados de *M. tuberculosis*

Al igual que la selección de centros de salud, también se seleccionaron aislados criopreservados de *M. Tuberculosis*.

Los aislados se seleccionaron siguiendo los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de Inclusión

- Aislados que tengan datos de Baciloscopia, Cultivo líquido MGIT o Sólido Löwenstein-Jensen y Prueba de susceptibilidad con resultados completos,
- Aislados que cuenten con cepas crio preservadas

Criterios de exclusión

- Aislados que tengan datos de Baciloscopia, Cultivo líquido MGIT o Sólido Löwenstein-Jensen y Prueba de susceptibilidad con resultados indeterminados, inconclusos o que no hayan desarrollado.
- Aislados sin cepas crio preservadas

Para la selección de los códigos de los aislados se realizó los siguientes pasos:

- 1) Filtrar los aislados por Centro de Salud
- 2) Filtrar los aislados por año de enrolamiento
- 3) Elegir al azar 10 códigos por año, intentado obtener 1 o 2 aislados por mes y 1 a 5 TB MDR por año.
- 4) Aproximadamente se eligen entre 30 códigos por centro de salud. Cabe indicar que no se cuentan con selecciones todos los meses del año.
- 5) La cantidad de aislados positivos para MTB en el periodo 2018 a 2021, fueron 35, por lo que todos entraron a la selección.

Se seleccionó 202 aislados positivos para MTB entre el periodo 2013-2021. Esta cantidad de aislados representa el 38.04% de aislados positivos a tuberculosis colectados entre los 5 centros de salud seleccionados.

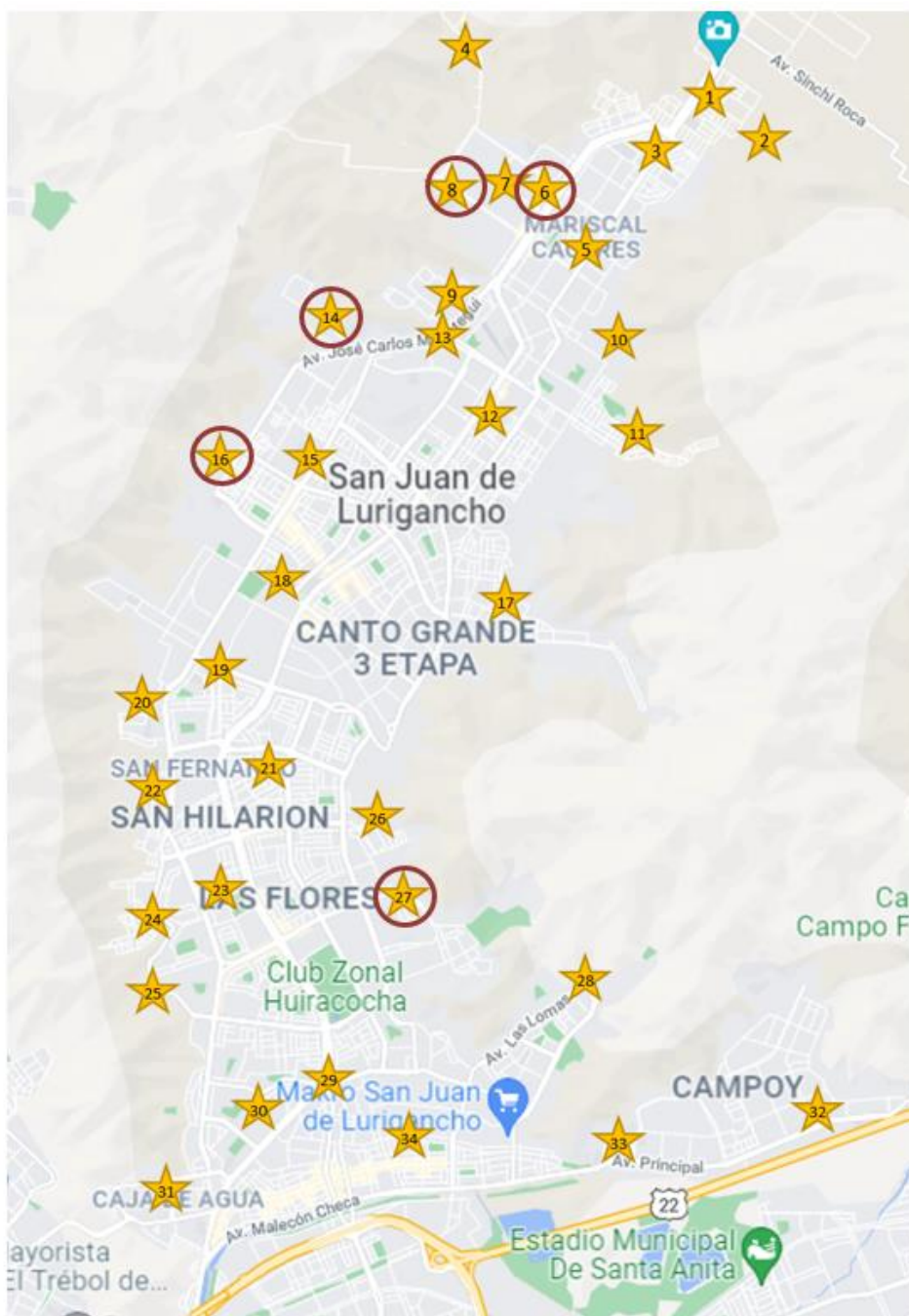


Figura 4. Mapa del distrito San Juan de Lurigancho. La ubicación de los centros de salud en el distrito se muestra con estrellas, cada número corresponde a un centro de salud. José Carlos Mariátegui (6), Juan Pablo II (8), Huáscar II (14), Huáscar XV (16) y La Libertad (27). Fuente: Unidad de Investigación en Tuberculosis del IMTAyH.

Las cepas seleccionadas fueron secuenciadas en el proyecto “Estudio genómico de la diversidad y transmisión de cepas de *M. tuberculosis* en el distrito de mayor incidencia de TB del Perú” que tiene SIDISI 103229, Proyecto Prociencia 011-2019. En ese estudio se sembraron aislados criopreservados de *M. tuberculosis* en medio Löwenstein-Jensen. Se extrajo ADN de las cepas de *M. tuberculosis* utilizando el kit de extracción de ADN GenJet de la marca Thermofisher. Se prepararon librerías utilizando el kit Nextera XT, las cuales se secuenciaron en un equipo Miseq de marca Illumina

Los archivos de obtenidos del secuenciamiento fueron utilizados en el presente estudio de tesis para los análisis del estudio.

Para el proyecto de tesis se emplearon los siguientes datos:

- Epidemiológicos: Fecha de colecta de muestra, sexo, género, edad, centro de salud.
- Laboratorio: Baciloscopia, estado de VIH, Prueba de susceptibilidad fenotípica a drogas de primera línea (Estreptomicina, Isoniacida, Rifampicina, Etambutol) obtenido por el kit BACTEC SIRE MGIT.

Estos datos se encontraban registrados en las bases de datos de la Unidad de Investigación en Tuberculosis del IMTAvH.

3.4. Materiales

- Laptop i7 con Windows 10
- Repositorio online TB-profiler (<https://tbdr.lshtm.ac.uk/>)
- Software FastQC v0.11.9
(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)
- Software BWA
- Software BCF Tools
(<http://samtools.github.io/bcftools/howtos/publications.html>)
- Software Itol V6 (<https://itol.embl.de/>)
- Software MoldeText

- Software RAXML
- Microsoft Excel
- STATA SE V16
- Información estadística sobre el número casos de tuberculosis respiratoria en centros de salud Huáscar XV, Huáscar II, José Carlos Mariátegui, La Libertad y Juan Pablo II del distrito San Juan de Lurigancho, en el periodo 2013 a 2021. Entregado por la Oficina de transparencia y Anticorrupción del MINSA.

3.5. Métodos

A continuación, se indican los procedimientos realizados en el presente proyecto para analizar las secuencias de genomas de *M. tuberculosis* obtenidas.

3.5.1. Análisis bioinformático

Se evaluó la calidad de las lecturas de extremos emparejados utilizando el programa `FastQC` v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) usando valores predeterminados.

Para obtener la predicción de linaje, sublinaje y resistencia a drogas de primera línea, se ejecutó, mediante línea de comandos, `TBProfiler` (<https://github.com/jodyphelan/TBProfiler/>) de forma predeterminada, esta herramienta utiliza la herramienta `Trimmomatic` para recortar las lecturas de baja calidad y adaptadores; también utiliza la herramienta `BWA` para alinear las lecturas cortas con el genoma de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv) y el programa `BCFtools` (<http://samtools.github.io/bcftools/howtos/publications.html>) para llamar a variantes de nucleótidos en formato VCF (Variant Call Format, por sus siglas en inglés), para predecir el linaje y las mutaciones asociadas con la resistencia a los fármacos antituberculosos de la base de datos TBDB (<https://github.com/jodyphelan/tbdb>).

Los archivos VCF resultantes se utilizaron con BCFtools para construir un genoma consenso a partir del genoma de referencia (H37Rv).

La anotación genómica se llevó a cabo utilizando el programa bakta, seguida por la generación del archivo del core-genoma mediante Panaroo utilizando los archivos gff3 (General Feature Format, por sus siglas en inglés).

La predicción de resistencia a drogas de primera línea obtenido por TB-Profiler, fue comparado contra los resultados de sensibilidad fenotípica a drogas de primera línea, obtenidos en los estudios observacionales, utilizando el método BACTEC SIRE MGIT.

3.5.2. Análisis filogenético

Para la creación de árboles filogenéticos, se obtuvieron los Variant call format (VCF), genes de resistencia, linaje y sublinaje utilizando el programa TB-Profiler.

Para la inferencia filogenética, se evaluaron varios modelos con el programa Modeltest para seleccionar el más idóneo, tras lo cual se empleó la herramienta online Raxml para construir el árbol filogenético con alta confiabilidad, utilizando 100 repeticiones para mejorar la precisión y fiabilidad de la topología del árbol.

Así mismo se utilizó el programa Itol V6 (<https://itol.embl.de/>) para generar la imagen del árbol filogenético acompañado de las predicciones de resistencia a drogas de primera línea.

3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó el software STATA SE Versión 16.

Se hizo un análisis descriptivo de la población, para aquellas variables categóricas, se presenta frecuencias. Para las variables numéricas se presenta media y desviación estándar si la variable sigue una distribución normal, o mediana y rango intercuartílico si la variable no sigue una distribución normal.

Se utilizó un análisis bivariado de Kappa para analizar la concordancia de los resultados de predicción de resistencia a drogas de primera línea, obtenidos por el secuenciamiento de genoma completo, y la susceptibilidad a drogas de primera línea, obtenidos por el método BACTEC SIRE MGIT.

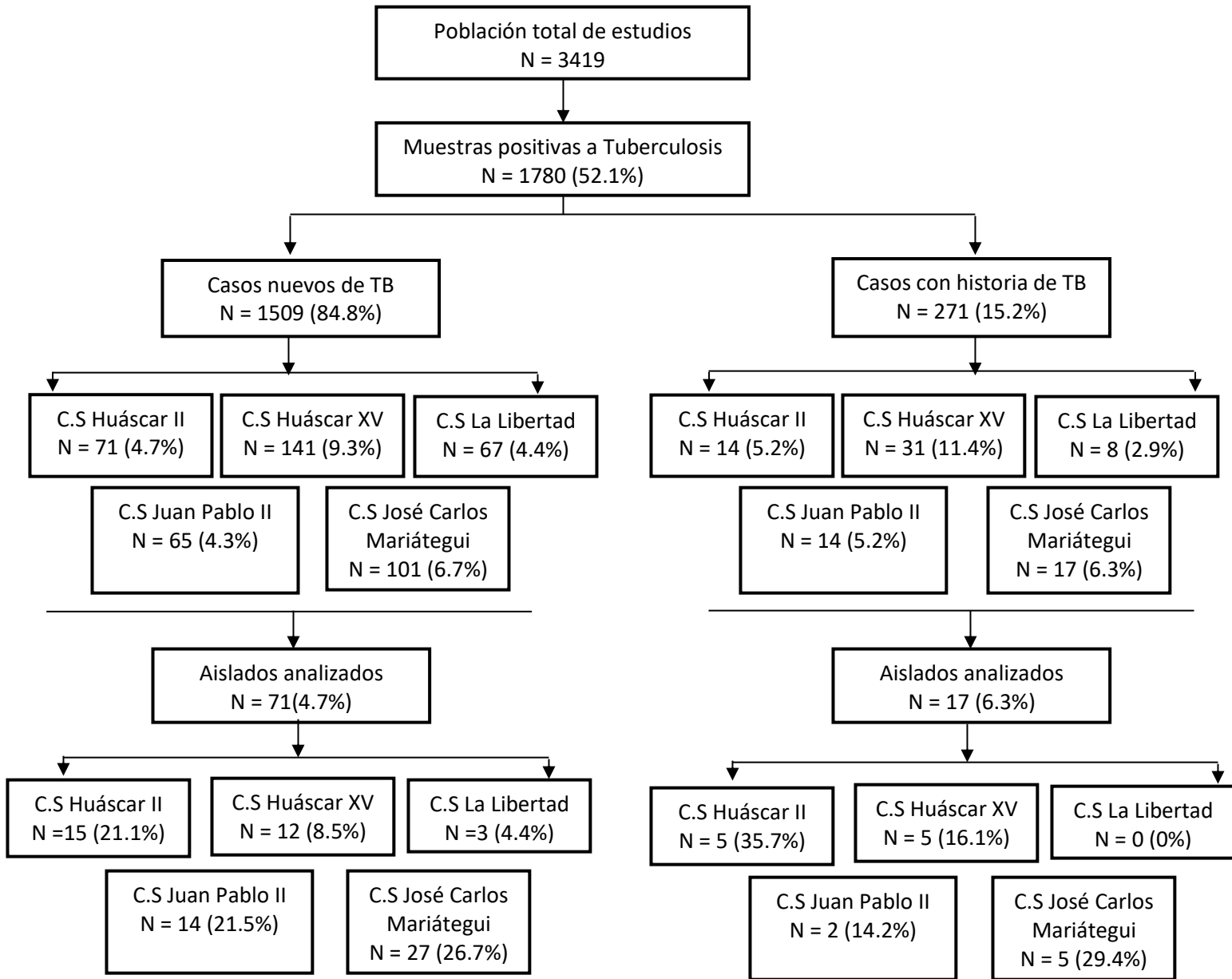
IV. Resultados

Se analizaron 88 secuencias de aislados de *M. tuberculosis*, colectadas en distintos centros de salud del distrito de San Juan de Lurigancho (Lima, Perú) durante el periodo 2013-2021. Estos 88 aislados representan el 4.9% de aislados positivos a tuberculosis registrados entre 5 estudios observacionales, realizados en el distrito de San Juan de Lurigancho en el periodo 2013 a 2021. Así mismo, representan el 16.6% de aislados positivos a TB colectados en los 5 centros de salud seleccionados.

En cuanto a la representatividad de los aislados analizados, en comparación a las muestras colectadas durante los estudios de investigación seleccionados. Se observa que en los estudios hubo una mayor presencia de aislados perteneciente a participantes sin historia previa de TB o nuevos casos de TB (84.4%). Entre los centros de salud seleccionados, el C.S Huáscar XV albergó la mayor cantidad de nuevos casos de TB; entre los aislados analizados en el presente estudio, el C.S José Carlos Mariátegui, presentó la mayor proporción de casos nuevos de TB.

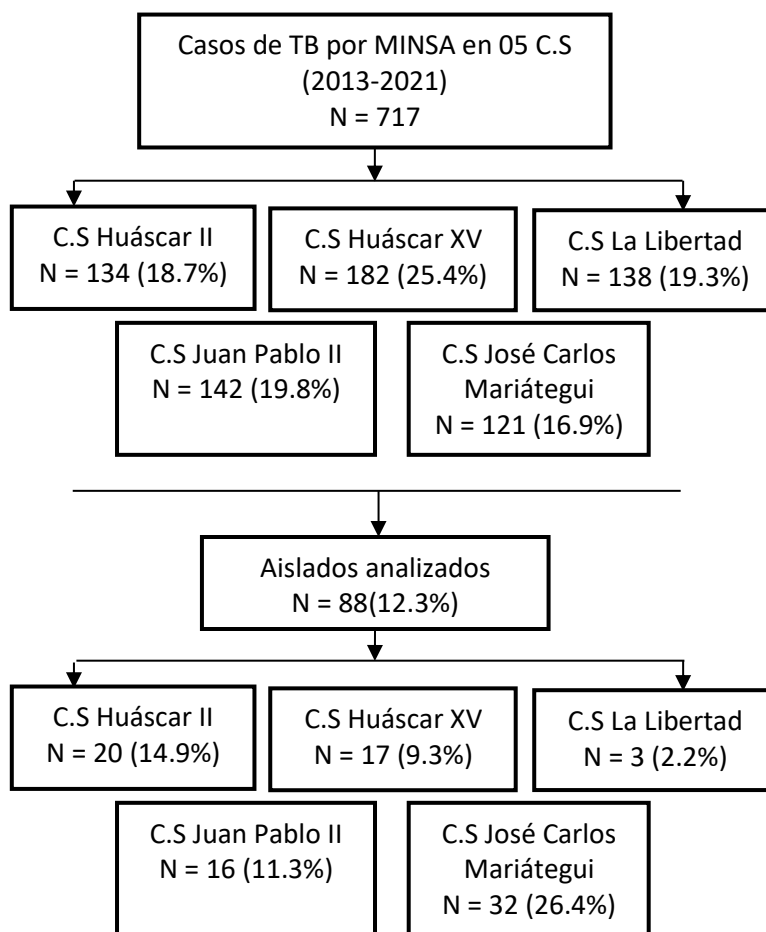
Entre los casos con historia previa de TB, se observó una frecuencia del 15.2% en la población de los estudios seleccionados, siendo nuevamente el C.S Huáscar XV aquel con mayor proporción de estos casos. En nuestro estudio, observamos una mayor proporción de aislados con historia previa de tuberculosis (6.3%), en comparación a los casos nuevos de

tuberculosis (4.7%), siendo el C.S José Carlos Mariátegui el que presenta mayor frecuencia de casos con historia previa de TB (Flujograma 1).



Flujograma 1. Representatividad de la muestra seleccionada en comparación a la población de los estudios analizados y los centros de salud seleccionados. Fuente: Unidad de Investigación en Tuberculosis del IMTAvH.

A pedido de una solicitud realizada a través del portal de transparencia del Ministerio de salud (MINSA), se recibió información sobre el número de casos de tuberculosis respiratoria confirmada y no confirmada bacteriológica e histológicamente en centros de salud del distrito de San Juan de Lurigancho; esta información fue entregada por la Oficina de Transparencia y Anticorrupción del MINSA. Esta información pertenece solamente a los centros de salud Huáscar XV, Huáscar II, José Carlos Mariátegui, La libertad y Juan Pablo II, del distrito de San Juan de Lurigancho, en el periodo 2013 a 2021. Se utiliza esta información para conocer la representatividad de los aislados secuenciados, en comparación a los casos reportados en cada centro de salud (Flujograma 2).



Flujograma 2. Representatividad de la muestra seleccionada en comparación al número de casos de TB respiratoria en centros de salud seleccionados (2013-2021). Fuente: Oficina de Transparencia y Anticorrupción del MINSA.

Se observa en la información proporcionada por MINSA que en el periodo 2013-2021, el centro de salud Huáscar XV fue el que presentó mayor número de casos (25.4%) de tuberculosis respiratoria. Las 88 cepas analizadas representan el 12.3% de casos de Tuberculosis respiratoria informadas por el MINSA. Al comparar las cepas secuenciadas en cada centro, contras los casos de TB respiratoria por centro de salud según información del MINSA, se observa que los aislados secuenciados representan el 26.4% de casos del centro de salud (Flujograma 2).

La población del presente estudio estuvo en su mayoría compuesta por hombres (69.3%); además, la mediana de edad de la población fue 28 años (RIQ 23-44). Se registró un 2.3% de casos positivos a VIH, y el 81.8% de participantes presentó baciloscopias positivas. (Tabla 1) El Centro de salud José Carlos Mariátegui presentó la mayor cantidad de aislados analizados. Por último, la mayor frecuencia de aislados analizados pertenecen al año 2017, y no se logró secuenciar ningún aislado del año 2019.

Tabla 1. Características de la muestra estudiada (n=88) †	
Características	
Sexo, n (%)	
Femenino	27 (30.7)
Masculino	61 (69.3)
Edad (años)+	28 (23-44)
Estado de VIH, n (%)	
Negativo	77 (87.5)
Positivo	2 (2.3)
Sin datos	9 (10.2)
Resultado Baciloscopia, n (%)	
Positivo	72 (81.8)
Negativo	16 (18.2)
Centro de Salud, n (%)	
José Carlos Mariátegui	32 (36.4)
Huáscar II	20 (22.7)
Huáscar XV	17 (19.3)
Juan Pablo II	16 (18.2)
La Libertad	3 (3.4)
Muestras por año, (n%)	
2013	8 (9.1)
2014	5 (5.7)
2015	20 (22.7)
2016	11 (12.5)
2017	28 (31.8)
2018	4 (4.5)
2019	0 (0.0)
2020	4 (4.5)
2021	8 (9.1)
+Mediana (RIQ)	
†Todos los valores suman 88	

Tabla 1. Características demográficas de la muestra analizada

Estreptomycin presentó la mayor frecuencia de monorresistencia (13.6%), seguido de Isoniacida (2.3%), no se registró monorresistencia a las drogas Rifampicina y etambutol. Más del 20% de las cepas presentaron resistencia a las drogas estreptomycin (23/88, 26.1%) e

isoniacida (20/88; 22.7%) según su prueba fenotípica de susceptibilidad a drogas de primera línea, mientras que un 15.9% de las cepas presentaron multidrogo resistencia.

Tabla 2. Resistencia fenotípica a fármacos de primera línea (n=88) †	
Monorresistencias, n (%)	
Estreptomicina	12 (13.6)
Isoniacida	2 (2.3)
Rifampicina	0 (0.0)
Etambutol	0 (0.0)
Todas las resistencias	
DST Estreptomicina, n (%)	
Sensible	65 (73.9)
Resistente	23 (26.1)
DST Isoniacida, n (%)	
Sensible	68 (77.3)
Resistente	20 (22.7)
DST Rifampicina, n (%)	
Sensible	72 (81.8)
Resistente	16 (18.2)
DST Etambutol, n(%)	
Sensible	79 (89.8)
Resistente	9 (10.2)
Multidrogo resistente, n(%)	
No	74 (84.1)
Si	14 (15.9)
†Todos los valores suman 88	

Tabla 2. Resistencia fenotípica a drogas de primera línea estreptomicina, isoniacida, rifampicina y etambutol, realizado en SIRE BACTEC MGIT, de la muestra analizada.

Los linajes, sublinajes y mutaciones asociadas a resistencia a drogas, fueron obtenidos utilizando el repositorio web TB-Profiler.

Tabla 3. Características de la muestra estudiada (n=88) †	
Linajes, n (%)	
L4	74 (84.1)
L2	14 (15.9)
Sublinaje, n (%)	
4.1.2.1	25 (28.4)
4.3.3	18 (20.5)
2.2.1	14 (15.9)
4.3.2	11 (12.5)
4.1.1	4 (4.6)
4.3.4.2	3 (3.4)
4.8	3 (3.4)
4.1.4	2 (2.3)
4.4.1	2 (2.3)
4.4.1.1	2 (2.3)
4	1 (1.1)
4.1.1.1	1 (1.1)
4.1.2	1 (1.1)
4.7	1 (1.1)
†Todos los valores suman 88	

Tabla 3. Linajes y sublinajes de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenidos por TB-Profiler, de la muestra analizada.

Se analizó la presencia y cantidad de aislados del linaje 2 y linaje 4 a través de los años analizados. Se observa una marcada diferencia en la frecuencia de ambos linajes, siendo linaje 4 el de mayor presencia durante todos los años (Figura 5).

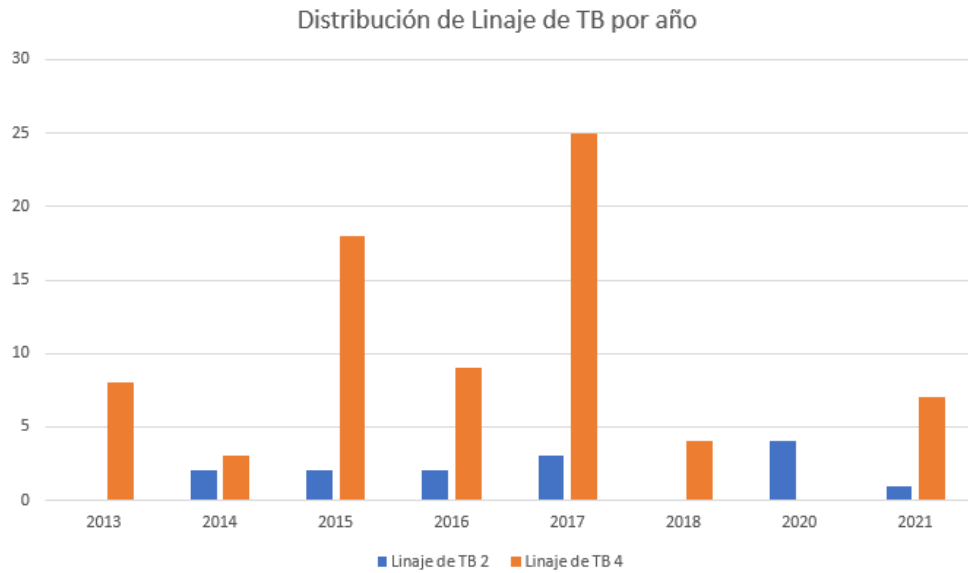


Figura 5. Cantidad de aislados según linaje de MTB por año

Se identificaron los linajes L4 (Euro-American) y L2 (East Asian), conformados por 14 sublinajes de *M. tuberculosis* (Tabla 3), siendo las más predominantes los sublinajes 4.1.2.1 (28.4%), 4.3.3 (20.5%), 2.2.1 (15.9%) y 4.3.2 (12.5%), (Tabla 4).

Tabla 4. Mutaciones genéticas en aislados secuenciados, según droga antituberculosa. (N=29) †			
Mutaciones	Frecuencia (%)	Catálogo de mutaciones OMS 2021 y 2023	
		Asociación a resistencia	Efecto de la mutación
Estreptomicina (N = 18), n (%)			
gid_p.Pro84Leu	4 (22.2)	Asociado con resistencia - <i>Interim</i>	<i>Missense variant</i>
gid_p.Leu108Arg	3 (16.7)	Significancia incierta	<i>Missense variant</i>
gid_c.319dupG	2 (11.1)	Asociado con resistencia – <i>Interim</i> *	
rpsL_p.Lys43Arg	2 (11.1)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
rpsL_p.Lys88Thr	2 (11.1)	Significancia incierta	<i>Missense variant</i>
gid_c.115delC	1 (5.6)	Asociado con resistencia – <i>Interim</i> *	
gid_p.Gln125*	1 (5.6)	Asociado a Resistencia	<i>Stop gained</i>
gid_p.Trp45*	1 (5.6)	Asociado con resistencia - <i>Interim</i>	<i>Stop gained</i>
rpsL_p.Lys88Arg	1 (5.6)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
rrs_n.514A>C	1 (5.6)	Asociado a Resistencia	<i>non_coding_transcript_exon_variant</i>
Isoniacida (N = 21), n (%)			
katG_p.Ser315Thr	15 (71.4)	Asociado a Resistencia (Resistencia de alta concentración)	<i>Missense variant</i>
fabG1_c.-15C>T	3 (14.3)	Asociado a Resistencia (También identificado como inhA_c-777)	<i>upstream_gene_variant</i>
fabG1_c.-17G>T	1 (4.8)	Asociado a Resistencia – <i>Interim</i> , resistencia a baja concentración (También identificado como inhA_g-779t) (¥)	<i>upstream_gene_variant</i>
katG_p.Asn138Ser	1 (4.8)	Significancia incierta	<i>Missense variant</i>
katG_p.Tyr155Ser	1 (4.8)	Significancia incierta	<i>Missense variant</i>
Rifampicina (N = 17), n (%)			
rpoB_p.Ser450Leu	9 (52.9)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
rpoB_p.Asp435Val	6 (35.3)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
rpoB_p.Asp435Tyr	1 (5.9)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
rpoB_p.Ser450Trp	1 (5.9)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
Etambutol (N = 13), n (%)			
embB_p.Tyr319Ser	4 (30.8)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
embB_p.Met306Ile	3 (23.1)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
embB_p.Met306Val	3 (23.1)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
embB_p.Asp354Ala	2 (15.4)	Asociado a Resistencia	<i>Missense variant</i>
embA_c.-12C>T	1 (7.7)	Significancia incierta (¥)	<i>upstream_gene_variant</i>
† En 29 aislados con mutaciones genéticas detectadas			
*Solo presente en Catálogo del año 2021			
(¥) Actualización en Catálogo año 2023.			

Tabla 4. Mutaciones genéticas asociadas a resistencia a drogas de primera línea.

Se analizaron 29 cepas de MTB que presentaron resistencia a drogas de primera línea (Estreptomomicina, isoniacida, rifampicina, etambutol). Isoniacida y estreptomomicina presentaron la frecuencia más elevada de mutaciones asociadas a resistencia. Respecto a isoniacida, se identificaron 5 tipos de mutaciones, siendo la mutación katG_Ser_p.315Thr (*KatG* S315T) la más predominante, detectada en 15 (71.4%) aislados. En el caso de estreptomomicina, la mutación más frecuente fue gid_p.Pro84Leu (*gid* P84L), presente en 4 aislados (22.2%). Adicionalmente, para la droga rifampicina, se identificaron 4 tipos de mutaciones, siendo rpoB_p.Ser450Leu (*rpoB* S450L) la más frecuente, hallada en 9 (52.9%) aislados con resistencia a rifampicina (Tabla 4).

Las mutaciones observadas se cotejaron con los catálogos de mutaciones de la OMS de los años 2021 y 2023, titulados “*Catalogue of mutations in M. tuberculosis complex and their association with drug resistance. Second edition*” (41,42). En relación a estreptomomicina, se encontró que 4 mutaciones estuvieron asociadas con resistencia, cuatro en revisión sobre su relación con resistencia a estreptomomicina (Asociado con resistencia – *Interim*), 2 con significancia incierta. Estas dos últimas de significancia incierta solo fueron encontradas en el catálogo de mutaciones 2021. En el caso de isoniacida, 3 mutaciones son asociadas a resistencia y 2 presentan significancia incierta. Para etambutol, se identificaron 4 mutaciones asociadas a resistencia y 1 mutaciones de significancia incierta. Por último, todas las mutaciones encontradas para Rifampicina fueron asociadas con resistencia.

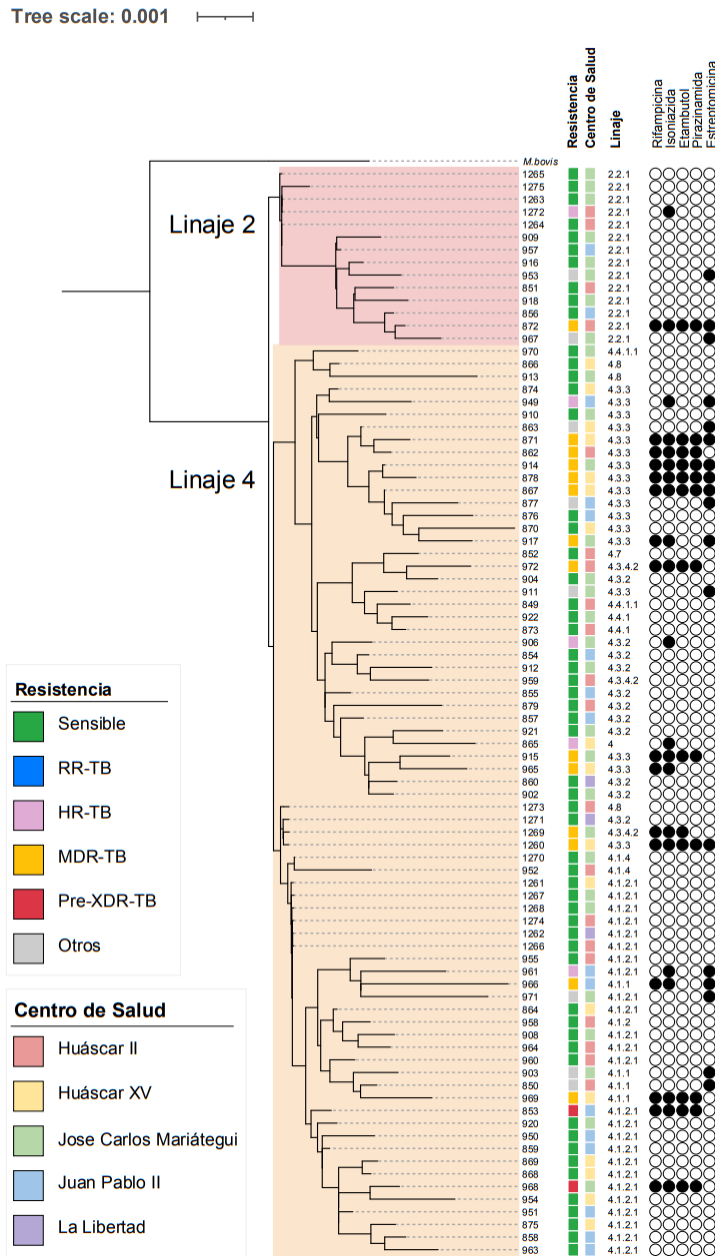


Figura 6. Árbol filogenético de 88 genomas completos. Se indican los centros de salud de origen y la predicción de sus patrones de resistencia a drogas de primera línea.

Se construyó un árbol filogenético tipo *maximum likelihood* que abarca las 88 cepas secuenciadas, empleando a *M. bovis* como punto de referencia para la raíz. Esta especie, aunque similar, presenta distancias filogenéticas con respecto a *M. tuberculosis* (43). Los círculos negros indican la predicción de resistencia genómica a las drogas de primera línea

(estreptomomicina, isoniacida, rifampicina y etambutol) mencionadas en el área superior del gráfico. Se observa que el árbol se divide en dos linajes: linaje 2 y linaje 4. Se destaca que la mayoría de aislados pertenecen al linaje 4, siendo este linaje donde se evidencia la mayor cantidad de aislados resistentes a drogas.

Tabla 5. Concordancia de DST fenotípico y WGS, Utilizando TB-Profiler							
Droga	DST Fenotípico Sensible		DST Fenotípico Resistente		Kappa	Agreement/ Concordancia	Prob>Z
	Sensible por WGS	Resistente por WGS	Sensible por WGS	Resistente por WGS			
Estreptomomicina	64 (98.46%)	1 (1.54 %)	6 (26.09%)	17 (73.91%)	0.78	92.05%	< 0.001
Isoniacida	67 (98.53 %)	1 (1.47 %)	0 (0.00%)	20 (100.00%)	0.97	98.86%	< 0.001
Rifampicina	71 (98.61%)	1 (1.39 %)	0 (0.00 %)	16 (100.00 %)	0.96	98.90%	< 0.001
Etambutol	75 (94.94 %)	4 (5.06 %)	0 (0.00 %)	9 (100.00 %)	0.79	95.45%	< 0.001

†Todos los valores suman 88

Tabla 5. Concordancia de DST fenotípico y WGSt

Se evaluó la concordancia de sensibilidad y resistencia fenotípica y genotípica, obtenida a través de WGS utilizando la prueba estadística *Kappa*; los resultados son observados en la tabla 5. Se observa una concordancia de susceptibilidad a drogas de 92.05% para estreptomomicina, y superior a 95% para isoniacida, rifampicina y etambutol, al comparar los resultados de sensibilidad y resistencia obtenidos por la prueba de susceptibilidad fenotípica BACTEC SIRE MGIT, y la predicción de resistencia a drogas obtenido por el WGS.

V. Discusión

El secuenciamiento de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) ha emergido como una técnica molecular de gran relevancia, destacándose por su capacidad de predicción de resistencias a drogas de primera y segunda línea en *M. tuberculosis*. Así mismo, esta herramienta es utilizado como apoyo para determinar mecanismos de transmisión de distintas enfermedades infecciosas (44).

Para el presente estudio se utilizó las secuencias obtenidas por WGS de 88 aislados de *M. tuberculosis* colectadas en el periodo 2013-2021 que provienen de 5 centros de salud del Distrito San Juan de Lurigancho en Lima, Perú.

La población del estudio estuvo mayoritariamente compuesta por hombres (69.3%); la mediana de edad de la población fue 28 años (RIQ: 23-44 años). Según el reporte mundial de tuberculosis de la OMS de 2018, a nivel global existe una mayor carga de tuberculosis en hombres, a comparación de mujeres, con una proporción que puede variar entre un rango de 2-4 hombres por cada mujer (5). El análisis de la situación epidemiológica de tuberculosis en Perú del 2015, mostró que durante el 2013 y 2014, el mayor porcentaje de casos de TB notificados fueron hombres (63% y 64% respectivamente); presentando 2 casos de TB en hombres, por cada caso en mujeres (11). La OMS indica que el 90% de casos de TB se registrar en adultos entre 25-54 años; en Las Américas la población entre 25-34 años fue la que notificó la mayor cantidad de casos de TB (5). En Perú, la población económicamente activa más joven (15-35 años) es la más afectada por esta enfermedad. Entre 2013 y 2014, el promedio de edad de las personas afectadas fue de 35 años (RIQ: 21-48 años) (11).

El análisis del perfil de resistencia fenotípica a drogas de primera línea de estos aislados, muestra que la mayor proporción de resistencia es a la droga estreptomycinina (26.1%), seguido de la droga Isoniacida (22.7%). Estos resultados se alinean con los hallazgos obtenidos por Quispe y colaboradores, quienes identificaron una prevalencia de 17.9% de resistencia a isoniacida y 21.2% para estreptomycinina en personas con tuberculosis con baciloscopia positiva, en muestra pertenecientes al periodo 2014-2015 en Lima, Perú (45). La presencia de resistencia a las drogas estreptomycinina e Isoniacida no es un fenómeno reciente, Ascencios y colaboradores reportaron una prevalencia de resistencia primaria (sin historia de TB) de 18.9% para Estreptomycinina y 11.5% a Isoniacida, en aislados recolectados en Perú entre 2005 y 2006. En personas previamente tratadas, la prevalencia de resistencia incrementaba, siendo 29.7% para Estreptomycinina y 30.3% para Isoniacida (46). Es importante destacar que la frecuencia de resistencia en nuestro estudio podría ser ligeramente más elevados. Esto se debe a que una fracción de la población incluida en este proyecto, formaban parte de estudios

de investigación en los cuales el criterio de inclusión era la presencia de tuberculosis drogo resistente.

También se analizó la mono resistencia de las drogas de primera línea, se observó que estreptomycin mostró la mayor frecuencia de mono resistencia, seguido por isoniazida. Otras investigaciones realizadas en Perú también observaron que estreptomycin presentaba la mayor frecuencia de mono resistencia (10.4-11.1%), seguido por isoniazida (2-5.8%) en nuevos casos de tuberculosis (45,46). Sin embargo, no se encontraron casos de mono resistencia a rifampicina y etambutol. Otros investigadores encontraron una baja frecuencia de mono resistencia a rifampicina (0.5%) y de etambutol (0-0.3%) (45-47), en nuestro estudio podría no haberse encontrado estos casos de mono resistencia al trabajarse con un bajo número de aislados.

Se identificó una proporción de 15.9% de multidrogo resistencia en la población estudiada. La prevalencia general de multidrogo resistencia en nuestro análisis supera los hallazgos de otros estudios que informan una prevalencia del 7-8.4% entre casos de tuberculosis con baciloscopia positiva para SJL (45,48). Este aumento en nuestra investigación podría atribuirse a la inclusión de pacientes con antecedentes previos de tuberculosis. A nivel mundial, la prevalencia de infección por cepas multidrogo resistente en nuevos casos de tuberculosis es de 3.8%, con variaciones en Perú entre 6% al 7.3%. Sin embargo, este valor se incrementa en casos de tuberculosis previamente tratado, alcanzando una prevalencia de multidrogo resistencia de 20% a nivel global, y entre 16.2% a 20% en Perú (45,49,50). Otra posible explicación para este aumento en la prevalencia, podría relacionarse con la selección de la población para nuestro estudio, ya que una parte de los participantes incluidos, pertenecían a estudios donde se buscaba casos de tuberculosis drogo resistente.

En relación a la diversidad genómica de *M. tuberculosis*, se ha establecido una asociación entre la diversidad genómica (Linajes y sublinajes) de MTB y los patrones de resistencia a drogas que podrían surgir. Por lo tanto, es esencial conocer la distribución y prevalencia de los linajes de MTB en el país (48,51). En este estudio, se identificaron 14 sublinajes de MTB, siendo la mayoría de ellos, parte del linaje Euro-Americano o linaje 4 (84.1%). Además, se

identificaron cepas pertenecientes al linaje Este asiático o linaje 2 (15.9%), en menor proporción. El linaje 4 es el más distribuido a nivel mundial y, como consecuencia, afecta a una mayor proporción de personas (51). En Sudamérica, la prevalencia del linaje 4 es alta; un estudio previo realizado por Barletta F. y colaboradores, en el distrito de San Juan de Lurigancho durante el periodo 2010-2011, encontró una prevalencia de 54.9% de cepas de MTB pertenecientes al linaje 4. En el presente estudio se observa que durante el periodo 2013-2021, el linaje 4 sigue siendo el más prevalente en la población de SJL (Figura 6). Se ha vinculado al linaje 4 con una mayor presencia de cavidades pulmonares, y probabilidad incrementada de falla en el tratamiento antituberculoso (48). El linaje 2 es el segundo linaje más común en Sudamérica. En el estudio de Barletta F. se encontró una prevalencia de 16.4% de este linaje en cepas de MTB. Este linaje ha sido asociado en diversas investigaciones con una mayor probabilidad de desarrollar resistencia a drogas, así como a multidrogo resistencia (52). En el estudio realizado por Acosta y colaboradores, se observó una marcada diferencia en la presencia de linaje 4 (93%) y linaje 2 (7%) en 60 aislados TB MDR colectados en SJL durante el periodo 2014-2015 (53). Esta discrepancia en las frecuencias entre linajes también se refleja en el árbol filogenético (Figura 6), donde se destaca una mayor presencia de aislados pertenecientes al linaje 4 en comparación al linaje 2.

Entre los 14 sublinajes identificados, los más frecuentes fueron 4.1.2.1 (28.4%), 4.3.3 (20.5%), 2.2.1 (15.9%) y 4.3.2 (12.5%). Esta diversidad de sublinajes se refleja también en el árbol filogenético (Figura 6). Baena y colaboradores también documentaron esta amplia variedad en su estudio, destacando que Perú exhibe la mayor diversidad de sublinajes de MTB en la región, registrándose 10 diferentes sublinajes. Además, señala que el sublinaje 4.1.2.1 fue el más prevalente en Suramérica con una frecuencia de 47% (54). En cuanto al sublinaje 4.3.3, Utpatel y colaboradores, observaron en aislados TB MDR colectados en Callao, Perú, durante el periodo 2017-2019, que el sublinaje más predominante fue 4.3.3, con una frecuencia del 57%. También observaron que los aislados pertenecientes al linaje 4.3.3, presentaban mutaciones de resistencia concomitante a drogas como pirazinamida, etambutol, etionamida y quinolonas (55). Este sublinaje es también predominante en Sudamérica, especialmente en comunidades indígenas de Brasil y Paraguay (54,56). El linaje L2 – Beijing se originó y expandió desde Asia Este, ha sido asociado con un aumento en la transmisión y

una alta prevalencia de TB MDR (57). Como se mencionó anteriormente, este linaje L2 llegó al Perú entre los años 1840-1880, con la inmigración de aproximadamente 100,000 trabajadores chinos, para laborar en latifundios, vías férreas e islas guaneras (58). Como resultado, Perú exhibe una mayor proporción de cepas del linaje L2 Beijing en comparación a sus países vecinos, representando el 9% de la población de MTB en el país (32).

El análisis de concordancia (Tabla 5) nos muestran que el WGS es una herramienta cuyos resultados son altamente concordantes con los obtenidos a través de susceptibilidad fenotípica BACTEC SIRE MGIT. La consistente alta especificidad y sensibilidad del WGS en comparación con las pruebas de susceptibilidad fenotípica, ha sido corroborada en diversos estudios (34,35,59). Por ende, se considera que el WGS podría ser una herramienta valiosa para orientar a decisiones terapéuticas en casos de tuberculosis resistentes a drogas.

Se analizaron las mutaciones genéticas en aquellos aislados que presentaron resistencia a una o más drogas de primera línea en la prueba de susceptibilidad fenotípica. Para la resistencia a la droga estreptomycin, se observó una notable diversidad de mutaciones genéticas, identificándose 5 tipos de mutaciones, siendo la mutación Pro84Leu en el gen *gidB* la más prevalente. Según el catálogo de mutaciones de la Organización mundial de la salud (OMS), esta mutación se encuentra en *interim* sobre su asociación a resistencia (41,42). Spies y colaboradores, indicaron en su estudio que la mutación P84L en el gen *gidB* (substitución CCG→CTG), estaba relacionada a resistencia de bajo nivel (baja concentración) en estreptomycin (60).

En cuanto a la droga Isoniacida, se identificaron cinco tipos de mutaciones, siendo la mutación katG_Ser_p.315Thr (*KatG* S315T) la más predominante. Desde principio de los años 2000, se conoce la alta prevalencia de la mutación S315T en el gen *KatG*. Mokrousov y colaboradores encontraron una prevalencia de 93.6% de la mutación *KatG* S315T en aislados de MTB en pacientes rusos, con y sin historial previo de tuberculosis (61). No obstante, la prevalencia de esta mutación en cepas resistente a isoniacida puede variar geográficamente (62). Mokrousov et al. encontraron en su estudio un 100% de concordancia entre la presencia de esta mutación y la resistencia fenotípica a isoniacida. Esta mutación se

ha convertido en un marcado clave en pruebas moleculares como Genotype MTBDR*plus*. Los mismos investigadores encontraron que esta mutación se encontraba más frecuentemente en cepas del linaje Beijing (61).

Para la droga Rifampicina, se identificaron cuatro tipos de mutaciones, siendo rpoB_p.Ser450Leu la más frecuente. Estas mutaciones son de importancia para la detección de resistencia a rifampicina en muestras de esputo y, por lo tanto, se encuentran incluidas en el catálogo de mutaciones detectadas por sistemas *Point of Care*, o en el lugar de asistencia, como el sistema GeneXpert MTB/RIF Ultra (63).

Para la droga Etambutol, se identificaron cinco tipos de mutaciones, siendo Tyr319Ser la más frecuente. Esta mutación ha sido documentada en varios estudios de WGS en cepas de MTB. En el estudio de Panova y col. Identificaron la mutación Tyr319Ser solo en participantes que eran negativos a VIH (64).

En este estudio no se analizó la resistencia fenotípica y genotípica de la droga de primera línea pirazinamida, principalmente debido a que los estudios utilizados para el análisis no evaluaron el uso de pirazinamida en las muestras colectadas. En el árbol filogenético (Figura 6), se puede observar que el software TB-Profiler también predijo la susceptibilidad genómica a la droga pirazinamida, obteniéndose 12 cepas con resistencia a dicha droga, esto representaría un 13.6% de frecuencia de resistencia a pirazinamida. En el estudio de Calderón y colaboradores, realiza en los años 2009 a 2010 en Lima- Perú, registraron 6.6% de resistencia basal a pirazinamida, incrementándose a 47.7% de resistencia en casos multidrogo resistente. Así mismo, se asoció el linaje LAM a una mayor presencia de resistencia a pirazinamida (65). En el árbol filogenético del presente estudio también se observa que la mayor cantidad de aislados con resistencia a pirazinamida se albergan en el linaje 4.

En resumen, en el distrito de SJL, el linaje L4 es el más predominante, exhibiendo una mayor diversidad de sublinajes a lo largo del periodo 2013-2021. Se observó que las mutaciones genéticas mayoritariamente implican cambios en aminoácidos, y que la mayoría de mutaciones registradas están directamente relacionadas con resistencia a fármacos

antituberculosos. Estos resultados nos indican la importancia de monitorear continuamente el perfil genético de las cepas de MTB circulantes, tanto a nivel distrital como nacional, proporcionando información crucial para la implementación de estrategias de salud pública para la prevención, control y tratamiento de la tuberculosis en el país.

VI. Conclusiones

- Se evidenció una mayor resistencia fenotípica en las drogas estreptomicina e isoniacida, con 15% de la población presentando tuberculosis multidrogo resistente.
- El linaje 4 (L4) predominó en las muestras analizadas a lo largo de todos los años de estudio, destacándose por su una mayor diversidad de sublinajes, siendo el sublinaje 4.1.2.1 el más prevalente.
- La mayoría de mutaciones genéticas observadas están vinculadas a resistencias, siendo los cambios en aminoácidos la causa más frecuente.
- Se registró un elevado porcentaje de concordancia entre los resultados de susceptibilidad fenotípica a drogas y la predicción de susceptibilidad a drogas por secuenciamiento de genoma completo.

VII. Limitaciones

Entre las limitaciones de este estudio se puede indicar que no se cuenta con la colección completa de aislados secuenciados para el periodo 2013-2021 en los distintos centros de salud:

- C.S Huáscar II, no cuenta con secuencias para el año 2018.
- C.S Huascas XV, no cuenta con secuencias para los años 2020 y 2021.
- C.S José Carlos Mariátegui, no cuenta con secuencias para el año 2013 y 2018.
- C.S Juan Pablo II, dispone únicamente aislados de *M. tuberculosis* desde el año 2013 al año 2017.
- C.S La Libertad cuenta solamente con 03 aislados, para los años 2017 y 2018.

Por último, no se analizaron muestras del año 2019 debido a temas presupuestales.

La carencia de secuencias en ciertos periodos de tiempo, genera que no pueda realizarse un análisis completo del periodo 2013-2021 para todos los centros de salud. Esto podría generar sesgos al reportar la diversidad de linajes de *M. tuberculosis* y genes que confieran resistencia a drogas en las cepas utilizadas. Sin embargo, los centros de salud Huáscar II, Huáscar XV, José Carlos Mariátegui y Juan Pablo II, se encuentran cercanos geográficamente, por lo que podrían presentar una diversidad genética de *M. Tuberculosis* similar.

Así mismo, el set de aislados a analizar es representativo del set completo, pero puede existir sesgos de selección.

VIII. Referencias bibliográficas

1. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2013; ;5(1).
2. Centers for Disease Control and Prevention. World TB Day 2024 [Internet]. 2024 [citado 14 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/globalhivtb/who-we-are/events/world-tb-day/worldtbdays.html>
3. World Health Organization. Global tuberculosis report, 2017 [Internet]. [citado 17 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/global-tuberculosis-report-2017>
4. Paul R. The Threat of Multidrug-resistant Tuberculosis. *J Glob Infect Dis.* 2018; 10(3):119-20.
5. WHO. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World health organization; 2018.
6. World Health Organization. WHO announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis [Internet]. 2021 [citado 15 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>

7. Mendoza Ticona A, Gotuzzo Herencia E. Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR): historia y situación actual. *Acta Médica Peru*. 2008; 25(4):236-46.
8. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *The Lancet*. 2019; 393(10181):1642-56.
9. Castañeda-Hernández DM, Rodríguez-Morales AJ. Epidemiological Burden of Tuberculosis in Developing Countries. *Curr Top Public Health [Internet]*. 2013 [citado 17 de marzo de 2021]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-public-health/epidemiological-burden-of-tuberculosis-in-developing-countries>
10. Soto-Cabezas MG, Chávez-Pachas AM, Arrasco-Alegre JC, Yagui-Moscoso MJA. Tuberculosis en trabajadores de salud en el Perú, 2013-2015. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2016; 33(4):607-15.
11. Ministerio de Salud (MINSA). Análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú 2015 [Internet]. [citado 17 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/vigilancia-epidemiologica/analisis-de-la-situacion-epidemiologica-de-la-tuberculosis-en-el-peru-2015/>
12. Global tuberculosis report 2023 [Internet]. [citado 15 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240083851>
13. Ministerio de Salud IN de S. I Evento Técnico - Científico Internacional «Optimizando el rol del laboratorio en la lucha contra la tuberculosis: avances en diagnóstico, innovación y calidad» - Situación de la Tuberculosis en el Perú - 22 de Marzo - 2024. Lima - Perú. 2024.
14. Kiefer EM, Shao T, Carrasquillo O, Nabeta P, Seas C. Knowledge and attitudes of tuberculosis management in San Juan de Lurigancho district of Lima, Peru. *J Infect Dev Ctries*. 2009; 3(10):783-8.

15. Suárez PG, Watt CJ, Alarcón E, Portocarrero J, Zavala D, Canales R, et al. The Dynamics of Tuberculosis in Response to 10 Years of Intensive Control Effort in Peru. *J Infect Dis.* 2001; 184(4):473-8.
16. Maulén NP. Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Médica Chile.* 2011; 139(12):1605-10.
17. Manjourides J, Lin H-H, Shin S, Jeffery C, Contreras C, Cruz JS, et al. Identifying multidrug resistant tuberculosis transmission hotspots using routinely collected data. *Tuberculosis.* 2012; 92(3):273-9.
18. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2017; 34(2):299-310.
19. Ministerio del Salud (MINSA) - DIRIS Lima Centro. Análisis de la situación de Salud del Distrito de San Juan de Lurigancho 2019. 2019.
20. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). POBLACIÓN DE LIMA METROPOLITANA SUPERA LOS 10 MILLONES 151 MIL HABITANTES. 17 de enero de 2023;
21. Municipalidad Distrital de San Juan de Lurigancho C distrital de seguridad ciudadana (CODISEC). Plan de acción distrital de seguridad ciudadana 2023 - San Juan de Lurigancho. 2023.
22. Ministerio del Salud (MINSA). Pacientes con coinfección de Tuberculosis y VIH recibirán atención especializada en San Juan de Lurigancho [Internet]. DIRIS LIMA CENTRO. 2018 [citado 22 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://dirislimacentro.gob.pe/pacientes-con-coinfeccion-de-tuberculosis-y-vih-recibiran-atencion-especializada-en-san-juan-de-lurigancho/>
23. Ministerio del Salud (MINSA) - DIRIS Centro. Vecinos de San Juan de Lurigancho recibieron charlas de prevención contra la TB [Internet]. 2019 [citado 22 de octubre de

- 2023]. Disponible en: <https://dirislimacentro.gob.pe/pobladores-de-san-juan-de-lurigancho-recibieron-charlas-de-prevencion-contr-la-tb/>
24. Veliz Silva MV. San Juan de Lurigancho, Análisis de la situación hospitalaria 2017 [Internet]. 2017 [citado 17 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.hospitalsjl.gob.pe/ArchivosDescarga/Epidemiologia/ASIS/ASISHO2017.pdf>
 25. Duarte R, Lönnroth K, Carvalho C, Lima F, Carvalho ACC, Muñoz-Torrice M, et al. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). *Pulmonology*. 2018; 24(2):115-9.
 26. Vallejo V P, Rodríguez D JC, Searle M A, Farga C V. Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis. *Rev Chil Enfermedades Respir*. 2015; 31(2):127-31.
 27. Molbio Diagnostics. Truenat® MTB Plus [Internet]. [citado 15 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.molbiodiagnostics.com/>
 28. Atashi S, Izadi B, Jalilian S, Madani SH, Farahani A, Mohajeri P. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for determination of rifampicin resistance among new tuberculosis cases in west and northwest Iran. *New Microbes New Infect*. 2017; 19:117-20.
 29. Lee RS, Pai M. Real-Time Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: Are We There Yet? *J Clin Microbiol*. 2017; 55(5):1249-54.
 30. Cannas A, Mazzarelli A, Di Caro A, Delogu G, Girardi E. Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains: A Fundamental Tool for Tuberculosis Control and Elimination. *Infect Dis Rep* [Internet]. 2016; 8(2): 6567
 31. Yin R, Kwok CK, Zheng J. Whole Genome Sequencing Analysis. En: Ranganathan S, Gribskov M, Nakai K, Schönbach C, editores. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*; 2019; 176-83.

32. Woodman M, Haeusler IL, Grandjean L. Tuberculosis Genetic Epidemiology: A Latin American Perspective. *Genes*. 2019; 10(1).
33. van der Werf MJ, Ködmön C. Whole-Genome Sequencing as Tool for Investigating International Tuberculosis Outbreaks: A Systematic Review. *Front Public Health*. 2019;7:87.
34. Wu X, Gao R, Shen X, Guo Y, Yang J, Wu Z, et al. Use of whole-genome sequencing to predict *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Shanghai, China. *Int J Infect Dis*. 2020; 96:48-53.
35. The Union. ABSTRACT BOOK, WORLD CONFERENCE ON LUNG HEALTH 2022 OF THE INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE (THE UNION) VIRTUAL EVENT 8 – 11 NOVEMBER 2022, OA03-216-15 Performance of whole-genome sequencing and the BACTEC MGIT 960 system in the analysis of anti-TB drugs under routine conditions in Peru: A comparison. 2023;
36. Mutayoba BK, Michael Hoelscher, Heinrich N, Joloba ML, Lyamuya E, Kilale AM, et al. Phylogenetic lineages of tuberculosis isolates and their association with patient demographics in Tanzania. *BMC Genomics*. 5 de agosto de 2022;23(1):561.
37. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. abril de 2018;16(4):202-13.
38. Tarazona D, Galarza M, Levano KS, Guio H. Análisis genómico comparativo de cepas peruanas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2016;33(2):256-63.
39. Torres Ortiz A, Coronel J, Vidal JR, Bonilla C, Moore DAJ, Gilman RH, et al. Genomic signatures of pre-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun*. 15 de diciembre de 2021;12(1):7312.

40. La Torre Silva R. Nota Histórica: Inmigración China en el Perú [Internet]. 1992 [citado 1 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v05n3/inmigraci%C3%B3n.htm>
41. World Health Organization. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance: supplementary document [Internet]. World Health Organization; 2021 [citado 23 de agosto de 2023]. Report No.: WHO/UCN/GTB/PCI/2021.7. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341906>
42. World Health Organization. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance, Second edition. 2023; Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240082410>
43. Kinene T, Wainaina J, Maina S, Boykin LM. Rooting Trees, Methods for. Encyclopedia of Evolutionary Biology. 2016;489-93.
44. Edokimov K, Yamada Y, Dary C, Miow QH, Hsu LY, Ong RTH, et al. Whole-genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis from Cambodia. Sci Rep. 11 de mayo de 2022;12(1):7693.
45. Quispe N, Asencios L, Obregon C, Velásquez GE, Mitnick CD, Lindeborg M, et al. The fourth national anti-tuberculosis drug resistance survey in Peru. Int J Tuberc Lung Dis. 1 de febrero de 2020;24(2):207-13.
46. Asencios L, Quispe N, Mendoza-Ticona A, Leo E, Vásquez L, Jave O, et al. Vigilancia nacional de la resistencia a medicamentos antituberculosos, Perú 2005-2006. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. julio de 2009;26(3):278-88.
47. Villegas L, Otero L, Sterling TR, Huaman MA, Van der Stuyft P, Gotuzzo E, et al. Prevalence, Risk Factors, and Treatment Outcomes of Isoniazid- and Rifampicin-Mono-Resistant Pulmonary Tuberculosis in Lima, Peru. PLoS One. 5 de abril de 2016;11(4):e0152933.

48. Barletta F, Otero L, de Jong BC, Iwamoto T, Arikawa K, Van der Stuyft P, et al. Predominant Mycobacterium tuberculosis Families and High Rates of Recent Transmission among New Cases Are Not Associated with Primary Multidrug Resistance in Lima, Peru. *J Clin Microbiol.* junio de 2015;53(6):1854-63.
49. Seung KJ, Keshavjee S, Rich ML. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* septiembre de 2015;5(9):a017863.
50. Ruvandhi R, Nathavitharana, Cynthia X. Shi, Leonid Chindelevitch, Roger Calderon, Zibiao Zhang, Jerome T. Galea, et al. Polyclonal Pulmonary Tuberculosis Infections and Risk for Multidrug Resistance, Lima, Peru. *Emerging Infectious Diseases.* noviembre de 2017;23(11).
51. Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, Grandjean L, Monteserin J, Debech N, et al. Global expansion of Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Sci Adv.* 17 de octubre de 2018;4(10):eaat5869.
52. Phyu AN, Si Thu Aung, Prasit Palittapongarnpim, Kyaw Ko Ko Htet, Surakameth Mahasirimongkol, Htin Lin Aung, et al. Distribution of Mycobacterium tuberculosis Lineages and Drug Resistance in Upper Myanmar. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(448).
53. Acosta F, Agapito J, Cabibbe AM, Cáceres T, Sola C, Pérez-Lago L, et al. Exportation of MDR TB to Europe from Setting with Actively Transmitted Persistent Strains in Peru - Volume 25, Number 3—March 2019 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* [citado 22 de octubre de 2023]; Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/3/18-0574_article
54. Baena A, Cabarcas F, Ocampo JC, Barrera LF, Alzate JF. Large genomic deletions delineate Mycobacterium tuberculosis L4 sublineages in South American countries. *PLOS ONE.* 19 de mayo de 2023;18(5):e0285417.
55. Utpatel C, Zavaleta M, Rojas-Bolivar DE, Mulhbach A, Picoy J, Portugal WJJ, et al. 2355. Prison as a Driver of Recent Transmissions of Multidrug-Resistant Tuberculosis

- in Callao, Peru. *Open Forum Infectious Diseases*. 1 de diciembre de 2022;9(Supplement_2):ofac492.162.
56. Molina-Torres CA, Quinn FD, Castro-Garza J, Gómez-Velasco A, Ocampo-Candiani J, Bencomo-Alarm A, et al. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates From an Amerindian Population in Chiapas, México. *Front Cell Infect Microbiol*. 13 de julio de 2022;12:875909.
 57. Rutaihwa LK, Menardo F, Stucki D, Gygli SM, Ley SD, Malla B, et al. Multiple Introductions of *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 2–Beijing Into Africa Over Centuries. *Frontiers in Ecology and Evolution* [Internet]. 2019 [citado 22 de octubre de 2023];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2019.00112>
 58. Anticona LN, Luis J. Desórdenes psiquiátricos de los inmigrantes chinos del siglo XIX. Primera parte: Inmigrantes chinos en el Manicomio del Cercado de Lima entre 1879 y 1902. *Anales de la Facultad de Medicina*. julio de 2016;77(3):269-75.
 59. Xiao YX, Liu KH, Lin WH, Chan TH, Jou R. Whole-genome sequencing-based analyses of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Taiwan. *Sci Rep*. 13 de febrero de 2023;13(1):2540.
 60. Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Martin A, Palomino JC, et al. Streptomycin Resistance and Lineage-Specific Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB Gene ▽. *J Clin Microbiol*. julio de 2011;49(7):2625-30.
 61. Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High Prevalence of KatG Ser315Thr Substitution among Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. mayo de 2002;46(5):1417-24.
 62. Tseng ST, Tai CH, Li CR, Lin CF, Shi ZY. The mutations of katG and inhA genes of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 1 de junio de 2015;48(3):249-55.

63. Ng KCS, van Deun A, Meehan CJ, Torrea G, Driesen M, Gabriëls S, et al. Xpert Ultra Can Unambiguously Identify Specific Rifampin Resistance-Conferring Mutations. *J Clin Microbiol*. 27 de agosto de 2018;56(9):e00686-18.
64. Panova AE, Vinokurov AS, Shemetova AA, Burmistrova IA, Shulgina MV, Samoilova AG, et al. Molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistant isolates from HIV- and HIV+ tuberculosis patients in Russia. *BMC Microbiology*. 19 de mayo de 2022;22(1):138.
65. Calderón RI, Velásquez GE, Becerra MC, Zhang Z, Contreras CC, Yataco RM, et al. Prevalence of pyrazinamide resistance and Wayne assay performance analysis in a tuberculosis cohort in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1 de agosto de 2017;21(8):894-901.